中国生态农业学报　2016 年 6 月　第 24 卷　第 6 期
Chinese Journal of Eco-Agriculture, Jun. 2016, 24(6): 736−743

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.151212

玉米秸秆生物炭对褐土微生物功能多样性及细菌群落的影响*

武爱莲[1]　丁玉川[1]　焦晓燕[1**]　王劲松[1]　董二伟[1]　郭　珺[1]　王　浩[2]

(1. 山西省农业科学院农业环境与资源研究所　太原　030006; 2. 山西大学生物工程学院　太原　030006)

摘　要　生物炭施入土壤被认为是一种有效的固碳减排措施, 可增加土壤有机碳及矿质养分含量, 提高土壤的持水能力及保肥能力。为探明其施入土壤后对土壤微生物活性及多样性的影响, 本文在盆栽试验条件下, 采用 Biolog 与高通量测序相结合的方法, 研究了 CK(不施生物炭)和施用 5 g·kg^{-1}、10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1}、60 g·kg^{-1}玉米秸秆生物炭对土壤微生物碳源利用能力(AWCD)、功能多样性指数以及土壤细菌的丰度和多样性的影响。结果表明, 随着生物炭施用量的增加, 表征土壤微生物活性的 AWCD 值呈下降趋势, 表现为: 5 g·kg^{-1}处理≈CK>10 g·kg^{-1}处理>30 g·kg^{-1}处理>60 g·kg^{-1}处理, 其中 CK 和 5 g·kg^{-1}处理间差异不显著(P>0.05), 而 10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1}和 60 g·kg^{-1}处理在整个培养期间的 AWCD 值显著低于 CK 处理(P<0.05); 土壤微生物群落代谢功能多样性指数(H')、碳源利用丰富度指数(S)均随生物炭施用量的增加而呈下降趋势, 但均匀度指数(E)表现出相反趋势, 5 g·kg^{-1}、10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1}、60 g·kg^{-1}各处理的 H'较 CK 处理分别增加 0.16%、−0.88%、−3.14%、−11.09%, S 分别增加−2.82%、−11.27%、−18.31%、−47.89%, E 分别增加 1.14%、3.00%、3.73%和 13.76%。主成分分析表明, 与 CK 处理比较, 5 g·kg^{-1}处理对土壤微生物群落碳源利用方式没有显著影响(P>0.05), 而 10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1}和 60 g·kg^{-1}处理对土壤微生物群落碳源利用方式影响显著(P<0.05)。随着生物炭施用量的增加, 土壤细菌 OTU 数目及丰富度指数(Chao1)呈增加趋势, 5 g·kg^{-1}处理与 CK 处理差异不显著, 而 10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1}、60 g·kg^{-1}处理的 OTU 数目较 CK 处理分别增加 1.09%、5.26%、24.42%, Chao1 分别增加 5.73%、10.21%、37.68%。土壤中施用生物炭后土壤细菌变形菌门(Proteobacteria)的丰度在 CK 处理和 5 g·kg^{-1}处理间差异不显著(P>0.05), 而 10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1}、60 g·kg^{-1}处理较 CK 处理分别增加 32.3%、21.1%、16.7%, 拟杆菌门(Bacteroidetes)的丰度随着生物炭施用量的增加各处理较 CK 处理分别减少 22.1%、55.3%、66.8%、50.5%。生物炭施入土壤后降低了土壤可培养微生物的活性, 减少或改变了土壤微生物碳源利用的种类, 使土壤原有微生物群落组分发生改变, 生物炭也影响了土壤细菌各菌群在土壤中的丰度, 使其分布的均匀性降低。为了不影响微生物群落结构和功能, 石灰性褐土上生物炭一次还田量不能超过 5 g·kg^{-1}(干土)。

关键词　生物炭　石灰性褐土　微生物活性　微生物多样性　Biolog　高通量测序　细菌群落
中图分类号: S154.36　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1671-3990(2016)06-0736-08

Effect of corn-stalk biochar on soil microbial functional diversity and bacterial community in cinnamon soils*

WU Ailian[1], DING Yuchuan[1], JIAO Xiaoyan[1**], WANG Jinsong[1], DONG Erwei[1], GUO Jun[1], WANG Hao[2]

(1. Institute of Agricultural Environment & Resources, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030006, China; 2. College of Biological Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract　Biochar application was considered as an effective way of carbon sequestration of soil. It has been known to

*　山西省农业科技攻关项目(20130311009-2)和山西省国际科技合作项目(2014081040)资助
** 通讯作者: 焦晓燕, 主要从事土壤养分循环利用等领域研究。E-mail: xiaoyan_jiao@126.com
武爱莲, 主要从事土壤微生态与植物营养研究。E-mail: wuping.20088@163.com
收稿日期: 2015−11−12　接受日期: 2016−01−08

*　This study was supported by the Agricultural Science and Technology Research Project of Shanxi Province (20130311009-2) and the International Science and Technology Cooperation Project of Shanxi Province (2014081040).
** Corresponding author, E-mail: Xiaoyan_jiao@126.com
Received Nov. 12, 2015; accepted Jan. 8, 2016

improve both soil water and nutrient holding capacity. As a key indicator of soil fertility, microorganism plays an important role in soil ecosystem. It was necessary to understand the influence of biochar application on microbial community and functional diversity in calcareous cinnamon soils for rational utilization of biochar in cinnamon soils. A pot experiment with five biochar application levels [0 $g\cdot kg^{-1}$ (as control), 5 $g\cdot kg^{-1}$, 10 $g\cdot kg^{-1}$, 30 $g\cdot kg^{-1}$ and 60 $g\cdot kg^{-1}$] was conducted to investigate the response of soil microbial activity and diversity, using Biolog analysis and high-throughput sequestration (HiSeq). The results showed that the average rate of color change (AWCD) decreased with increasing biochar application level, and the AWCD values were in the order of 5 $g\cdot kg^{-1}$ ≈ control > 10 $g\cdot kg^{-1}$ > 30 $g\cdot kg^{-1}$ > 60 $g\cdot kg^{-1}$ treatments. There was no significant difference between control and 5 $g\cdot kg^{-1}$ treatments in terms of AWCD. The soil microbial community diversity index (H') and richness index (S) also decreased, but evenness index (E) increased with increasing biochar application level. Compared with the control, biochar application rates at 5 $g\cdot kg^{-1}$, 10 $g\cdot kg^{-1}$, 30 $g\cdot kg^{-1}$ and 60 $g\cdot kg^{-1}$ increased H' by 0.16%, –0.88%, –3.14% and –11.09%; increased S by –2.82%, –11.27%, –18.31% and –47.89%; and increased E by 1.14%, 3.00%, 3.73% and 13.76%; respectively. Principal component analysis showed that carbon substrate utilization of soil microbial community was significantly affected by 10 $g\cdot kg^{-1}$, 30 $g\cdot kg^{-1}$ and 60 $g\cdot kg^{-1}$ biochar application. HiSeq analysis showed that soil bacterial OTU enhanced significantly by 1.09%, 5.26% and 24.42%, respectively, in 10 $g\cdot kg^{-1}$, 30 $g\cdot kg^{-1}$ and 60 $g\cdot kg^{-1}$ biochar treatments, meanwhile, the richness index (Chao1) was increased by 5.73%, 10.21% and 37.68%, respectively, compared with that of control. Biochar enhanced the abundance of bacteria and decreased the evenness of soil bacterial distribution. Proteobacteria abundance was significantly increased by 32.3%, 21.1% and 16.7%, respectively, under 10 $g\cdot kg^{-1}$, 30 $g\cdot kg^{-1}$, 60 $g\cdot kg^{-1}$ biochar treatment, while Bacteroidetes abundance decreased obviously by 22.1%, 55.3%, 66.8% and 50.5%, respectively, compared with those of control. The results indicated that the rational dosage of biochar application was not more than 5 $g\cdot kg^{-1}$ (soil dry) in calcareous cinnamon soil to maintain the microbial community structure and activity.

Keywords　Biochar; Calcareous cinnamon soil; Microbial activity; Microbial diversity; Biolog; High-throughput sequencing; Bacterial community

我国作物秸秆资源丰富, 约占世界总量的 25%左右[1]。2001—2010 年, 中国平均年产粮食作物秸秆约 5.1×10^8 t, 而每年的焚烧量约占作物秸秆总量的 21.6%, 排放的 CO、CO_2及总碳量分别为 1.15×10^7 t、1.57×10^8 t 和 4.77×10^7 t。这不仅造成了资源的浪费, 也极大地污染了环境[2]。生物炭(或生物质炭, bio-charcoal)是近年来较受关注的研究热点, 指生物有机材料在低氧或缺氧环境中经高温裂解后形成的产物[3−4]。将作物秸秆废弃物高温裂解生产生物炭施入土壤中可实现碳的封存[5], 减少 CO_2 的排放[6]。

生物炭含有作物生长所必需的大量和中微量元素, 且其孔隙结构发达, 比表面积巨大, 具有很强的吸附能力[7], 目前已被广泛应用于农业生产。有关生物炭对土壤理化特性的影响已做了大量研究, 结果表明生物炭可增加土壤有机碳及矿质养分含量[8−12], 提高土壤的持水能力及保肥能力[13−15], 从而提高肥料养分的利用效率[16−17]。但在土壤生态系统中, 几乎所有的养分转化过程都离不开土壤微生物的作用, 它们直接或间接参与土壤有机质分解、无机营养的循环、改善土壤结构等[18−19]。生物炭的多孔结构及对水肥的吸附作用使其为土壤微生物生长与繁殖提供了良好的栖息环境[20], 施入生物炭后土壤细菌、真菌和古菌的群落结构都发生了变化, 富含生物炭的亚马逊黑土的细菌多样性比未作处理的土壤增加 25%, 而古菌和真菌的多样性下降[21−22]。也有研究表明, 施入生物炭后森林土壤的细菌多样性下降[22], 生物炭对微生物的群落分布具有一定的控制作用[23]。目前有关生物炭对土壤微生物群落多样性影响的报导多集中在酸性土壤上[24], 而在石灰性褐土上生物炭对土壤微生物群落多样性的影响却鲜见报导。本文以秸秆生物炭为研究对象, 采用 Biolog 与高通量测序相结合的方法研究在石灰性褐土上施用生物炭后土壤微生物群落的变化特征, 旨在明确秸秆生物炭对石灰性土壤微生物群落的影响, 为生物炭在石灰性褐土上的合理使用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料

试验所用土壤采自山西省农业科学院东阳试验基地 0~20 cm 耕层, 土壤类型为石灰性褐土, 土壤质地为砂质黏壤土(<0.002 mm 黏粒 19.8%, 0.02~0.002 mm 粉粒 22.3%, 2~0.02 mm 砂粒 57.9%)。供试土样风干后过 2 mm 筛备用。供试土壤化学性质为: 有机碳 3.71 $g\cdot kg^{-1}$, 全氮 0.48 $g\cdot kg^{-1}$, 有效磷 3.08 $mg\cdot kg^{-1}$, 速效钾 83.82 $mg\cdot kg^{-1}$, CEC 13.14 $cmol\cdot kg^{-1}$, pH 8.3, EC 0.16 $mS\cdot cm^{-1}$。供试生物炭由山西省工霄商社生产, 由玉米秸秆在 300~500 ℃微氧环境下碳化而成,

生物炭过 2 mm 筛备用。生物炭基本化学性质：全碳 369.87 g·kg^{-1}，全氮 6.56 g·kg^{-1}，CEC 59.2 cmol·kg^{-1}，pH 10.22，EC 10.97 mS·cm^{-1}。供试作物为'晋杂 34 号'高粱。

1.2 试验设计

试验采用盆栽方法，共设 5 个生物炭施用水平，即生物炭施用量分别为 0(CK)、5 g·kg^{-1}、10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1}、60 g·kg^{-1}(分别相当于 0 t·hm^{-2}、13.5 t·hm^{-2}、27 t·hm^{-2}、81 t·hm^{-2}和 162 t·hm^{-2})，每个处理 3 次重复。N、P_2O_5和 K_2O 的添加量分别为 0.2 g·kg^{-1}、0.15 g·kg^{-1}和 0.15 g·kg^{-1}，装盆前与土壤充分混匀，再与生物炭充分混匀后装入高 18 cm、宽 21 cm 的试验用塑料桶；每桶装土 4 kg，各桶补充等量水分使土壤熟化 3 周。

试验于日光温室内进行，2014 年 4 月 15 日播种，7 月 2 日收获。试验结束时采集土壤样品，采样时轻轻去掉表层 2 cm 的土壤，采集 2 cm 以下土壤鲜样并立即放入冰盒带回实验室置于 4 ℃冰箱保存待测。

1.3 Biolog 分析

称取 10.0 g 新鲜土样置于装有 90 mL 已灭菌生理盐水(0.85% NaCl)的三角瓶内，在转速 200 r·min^{-1}下振荡 30 min，静置 10 min 后用生理盐水(0.85% NaCl)稀释到 10^{-3}，将稀释好的土壤悬浊液 150 μL 接种到 Biolog-Eco 板(BIOLOG, Hayward, USA)的每个微孔中，接种后的 Eco 板在 25 ℃下培养。每隔 24 h 用 Biolog Reader 仪(BIOLOG, Hayward, USA)测定波长 590 nm 和 750 nm 的吸光值。

采用 Glassen 等[25]的方法分析 Eco-MicroPlate 的单孔平均吸光度，即将单孔在 590 nm 和 750 nm 的吸光值分别减去各自对照孔的吸光值，再用每个对应孔 590 nm 的值减去 750 nm 的值为单孔实际颜色反应的吸光值。利用该数据，采用 Garland 和 Mills[26]的方法计算单孔平均吸光度值。

$$平均吸光度(AWCD)=\sum(A_i-A_0)/n \qquad (1)$$

式中：A_i 为各单孔实际吸光值，A_0 为对照孔的吸光值，A_i-A_0 为负值时则归为 0，n 为碳源种类(Eco-MicroPlate 为 31)，AWCD 值为 3 次重复的平均值。

用 Shannon-Weinner 丰富度指数、Shannon-Weinner 均匀度指数、碳源利用丰富度指数表征土壤微生物群落功能代谢多样性[27]。采用 Eco-MicroPlate 培养 96 h 的吸光值计算土壤微生物群落功能代谢多样性指数，计算公式别为：

$$\text{Shannon-Weinner 多样性指数}(H')=-\sum P_i \ln P_i \qquad (2)$$

式中：$P_i=(A_i-A_0)/\sum(A_i-A_0)$，$A_i$、$A_0$ 含义同上 式，P_i 为有碳源的孔与对照孔的吸光值之差与整个微板总差的比值。

$$\text{Shannon-Weinner 均匀度指数}(E)=H'/\ln S \qquad (3)$$

式中：H'为 Shannon-Weinner 多样性指数，S 为有颜色变化的孔数量。

$$碳源利用丰富度指数(S)=被利用碳源的总数 \qquad (4)$$

碳源利用丰富度指数即颜色变化的孔数，吸光值小于 0.25 视为颜色没有变化。

1.4 土壤细菌高通量测序

采取 OMEGA(D5625-01)试剂盒方法提取土壤微生物基因组总 DNA，操作步骤参照试验盒说明书。提取物保存于–20 ℃冰箱备用。

利用通用引物(341F-805R)扩增微生物 16SrDNA 基因的 V3-V4 区域，引物组成：341F: CCTACGGGNGGCWGCAG; 805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC。PCR 反应体系如下：5 μL 的 10×PCR Buffer, 0.5 μL 的 dNTP(10 mmol·L^{-1} each), 10 ng 的 Genomic DNA, 0.5 μL 的 Bar-PCR primer F(50 μmol·L^{-1}), 0.5μL 的 Primer R(50 μmol·L^{-1}), 0.5 μL 的 Plantium Taq (5 U·μL^{-1})，加无菌水使反应总体系为 50 μL。PCR 反应条件如下：94 ℃ 3 min, 5×(94 ℃ 30 s, 45 ℃ 20 s, 65 ℃ 30 s), 20×(94 ℃ 20 s, 55 ℃ 20 s, 72 ℃ 30 s), 72℃ 5 min。PCR 产物进行琼脂糖电泳并对 DNA 进行切胶回收，利用 Qubit2.0 DNA 检测试剂盒对回收的 DNA 精确定量，等量混合后测序。

1.5 数据统计分析

高通量数据分析主要步骤为：1)根据 barcode 序列将各样本区分开并去除 barcode; 2)去除短片段序列(序列长度小于 200 bp)及低质量序列(平均质量值小于 20); 3)利用 Uclust 软件根据序列之间的相似度(97%)将 16SrDNA 基因序列归为不同的操作分类单元(OTU); 4)从每个 OTU 序列中选取代表性序列，采用 RDP classifier 软件(分类阈值大于 80%)对序列进行分类鉴定，得到细菌的分类学信息。

利用 mothur 软件计算土壤细菌 α 多样性指数，其中，Chao1 丰富度指数计算公式为：

$$S_{chao1}=S_{obs}+N_1^2/2(N_2+1)-N_1N_2/2(N_2+1)^2 \qquad (5)$$

式中：S_{obs} 为检测到的所有 OTU 的总数，N_1 为只有一条序列的 OTU 数目，N_2 为只有两条序列的 OTU 数目。

Shannon多样性指数计算公式为：

$$S_{Shannon}=-\sum n_i/N \ln n_i/N \qquad (6)$$

式中：n_i为各分类单元中包含的序列数，N为所有数列之和。

采用 SPSS 18.0 进行方差(Duncan 检验法)和主成分分析，Microsoft Excel 2007 软件作图。差异显著

性水平设为 α=0.05。

2　结果与分析

2.1　不同用量生物炭处理土壤微生物利用碳源的动态特征

平均颜色变化率(AWCD)表示可培养微生物对不同底物(碳源)的利用能力, 在一定程度上反映了土壤微生物的生理代谢活性。通过对 31 种碳源 AWCD 值的动态监测(每隔 24 h)可知: 随着培养时间的延长, 各处理 AWCD 值均呈增长趋势。培养前 24 h, 各处理 AWCD 值均很低, 24 h 后迅速升高, 说明碳源逐渐被利用, 微生物代谢活性增强。CK、5 g·kg^{-1}、10 g·kg^{-1}处理在培养 72 h 前 AWCD 值差异不显著(P>0.05), 72 h 后 10 g·kg^{-1}处理显著低于 CK 和 5 g·kg^{-1}处理(P<0.05); 30 g·kg^{-1}和 60 g·kg^{-1}处理的 AWCD 值在整个培养期间均显著低于其他处理(P<0.05), 说明高量生物炭的施入影响了微生物利用碳源的能力, 其代谢活性降低。培养结束时, 各处理的 AWCD 值表现为: 5 g·kg^{-1}≈CK>10 g·kg^{-1}>30 g·kg^{-1}>60 g·kg^{-1}, 5 g·kg^{-1}、10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1}和 60 g·kg^{-1}处理较 CK 处理分别增加 1.57%、–9.67%、–27.84%和–53.73%(图 1)。

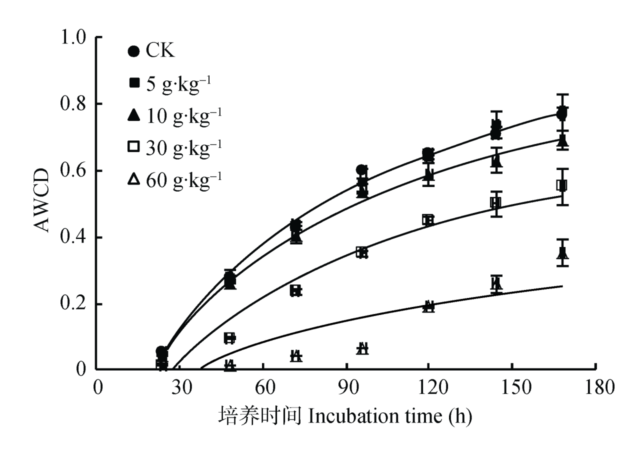


图 1　不同用量生物炭处理石灰性褐土土壤微生物利用不同种类碳源的平均颜色变化率(AWCD)

Fig. 1　Average well color development (AWCD) for different carbon sources utilized by calcareous cinnamon soil microbial under different application rates of biochar

2.2　不同用量生物炭处理土壤可培养微生物多样性指数

从表 1 可以看出, 随生物炭施用量增加土壤微生物代谢功能的多样性指数、碳源利用丰富度指数均呈减小趋势, 而均匀度指数则呈增加趋势。5 g·kg^{-1}生物炭处理的多样性指数最高, CK 和 5 g·kg^{-1}处理间差异不显著(P>0.05), 其余 3 个处理间差异显著, 且都显著低于 5 g·kg^{-1}和 CK 处理(P<0.05), 5 g·kg^{-1}、10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1}和 60 g·kg^{-1}处理较 CK 处理分别增加 0.16%、–0.88%、–3.14%和–11.09%; 均匀度指数随着生物炭施用量的增加而增加, 60 g·kg^{-1}处理的均匀度指数显著高于 CK、5 g·kg^{-1}、10 g·kg^{-1}和 30 g·kg^{-1}处理, 5 g·kg^{-1}、10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1}和 60 g·kg^{-1}处理较 CK 处理分别增加 1.14%、3.00%、3.73%和 13.76%。碳源利用丰富度指数随着生物炭用量的增加而降低, 但 CK、5 g·kg^{-1}、10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1}处理间差异不显著(P>0.05), 而 60 g·kg^{-1}处理显著低于以上处理(P<0.05)。

表 1　不同用量生物炭处理石灰性褐土土壤微生物代谢功能多样性指数

Table 1　Metabolic functional diversity index of microbial community of cinnamon soil under different application rates of biochar

生物炭施用量 Application rate of biochar (g·kg^{-1})	多样性指数(H') Shannon-Wiener index	均匀度指数(E) Evenness index	碳源利用丰富度指数(S) Richness index
0 (CK)	3.056±0.002a	0.966±0.007b	23.667±0.577a
5	3.061±0.012a	0.977±0.011b	23.000±1.000a
10	3.029±0.001b	0.995±0.016b	21.000±1.000a
30	2.960±0.009c	1.002±0.038ab	19.333±2.082a
60	2.717±0.007d	1.099±0.027a	12.333±2.887b

同列不同字母表示差异显著(P<0.05), n=3。Different letters in the same column show significant difference (P < 0.05, n=3).

2.3　不同用量生物炭处理土壤微生物主成分分析

主成分分析(principal component analysis, PCA)是采取降维的方法将多个变量转化为少数几个综合变量的方法。Garland[28]认为各处理在空间位置上的差异与聚集在坐标轴上的碳源是相关联的。根据 96 h 的 AWCD 进行碳源利用主成分分析, 从 31 个变量中提取 4 个主成分, 其累积贡献率达 97.5%。第 1 主成分(PC1)贡献率为 54.06%, 第 2 主成分(PC2)的贡献率为 24.40%, 第 3、4 主成分贡献率分别为 11.74%和 7.55%。对前 2 个主成分进行分析, 将不同处理在 2 个主成分上的得分值以 PC1、PC2 为横纵坐标作图(图 2)。从图中可以看出, 在 PC1 轴上, 各处理被分为 2 类, CK、5 g·kg^{-1}和 10 g·kg^{-1}处理分布在 PC1 轴的正方向, 且 CK 和 5 g·kg^{-1}处理聚在起, 说明其土壤微生物群落具有相似的碳源利用模式, 其代谢功能相似; 而 30 g·kg^{-1}和 60 g·kg^{-1}处理分布于 PC1 轴的负方向上。在 PC2 轴上, 各处理被分为 2 类, CK、5 g·kg^{-1}和 30 g·kg^{-1}处理位于 PC2 轴的正方向, 10 g·kg^{-1}和 60 g·kg^{-1}处理位于 PC2 轴的负方向。

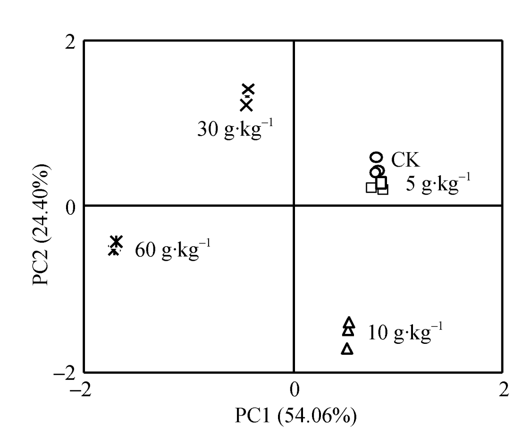


图 2 不同用量生物炭处理石灰性褐土土壤微生物碳源利用的主成分分析

Fig. 2 Principal component analysis of microbial community utilizing carbon sources of cinnamon soil under different application rates of biochar

2.4 高通量测序分析不同用量生物炭处理土壤细菌多样性

从表 2 可以看出, OTU 数目随着生物炭施用量的增加基本呈增加趋势, CK、5 g·kg^{-1}和 10 g·kg^{-1}处理间差异不显著(P>0.05), 30 g·kg^{-1}和 60 g·kg^{-1}处理显著大于以上处理(P<0.05)。5 g·kg^{-1}、10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1}和 60 g·kg^{-1}处理 OTU 数目较 CK 处理分别增加−2.57%、1.09%、5.26%和 24.42%, 说明生物炭施用量大于 5 g·kg^{-1}时可以增加土壤细菌 OTU 的数目。Chao1 指数用来估计群落中物种的总数, 随着生物炭施用量的增加, 该指数呈增加趋势, 整体表现为 60 g·kg^{-1}>30 g·kg^{-1}>10 g·kg^{-1}>CK>5 g·kg^{-1}处理, CK 和 5 g·kg^{-1}处理间差异不显著(P>0.05), 其余各处理间差异显著, 且显著大于 CK 和 5 g·kg^{-1}处理(P<0.05), 各处理较 CK 处理分别增加−0.16%、5.73%、10.21%和 37.68%。Shannon 指数用来描述群落中个体出现的不确定性, 该指数越大, 群落多样性越高。可以看出, 60 g·kg^{-1}生物炭用量下该指数最高, 与 5 g·kg^{-1}、10 g·kg^{-1}和 30 g·kg^{-1}处理间差异显著(P<0.05), 但与 CK 处理差异不显著(P>0.05), 5 g·kg^{-1}、10 g·kg^{-1}和 30 g·kg^{-1}处理间差异不显著(P>0.05)。

表 2 不同用量生物炭处理石灰性褐土土壤细菌基因的 α 多样性指数

Table 2 α-diversity index of soil bacterial gene of cinnamon soil under different application rates of biochar

生物炭施用量 Application rate of biochar (g·kg^{-1})	操作分类单元数目 OTU number	丰富度指数 Chao1 index	多样性指数 Shannon index
0 (CK)	3 869.33±91.88c	8 391.19±138.96d	7.22±0.08a
5	3 770.00±86.71c	8 377.63±126.63d	7.09±0.10b
10	3 911.67±88.08c	8 871.63±134.94c	7.05±0.05b
30	4 073.00±81.06b	9 248.05±199.26b	7.07±0.05b
60	4 814.33±79.61a	11 553.16±208.75a	7.27±0.06a

2.5 高通量测序分析不同用量生物炭处理土壤细菌在门水平的相对丰度

图 3 表明, 石灰性褐土的主要细菌菌群包括变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、浮霉菌门(Planctomycetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、厚壁菌门(Firmicutes)、绿弯菌门(Chloroflexi)以及分类地位不明确和一些稀有的细菌菌群。其中变形菌门是土壤中最为优势的菌群, 占总 reads 数的 39.68%, 生物炭施用量为 5 g·kg^{-1}时土壤中该类群细菌的丰度与 CK 处理差异不显著, 生物炭施用量大于 5 g·kg^{-1}时, 土壤中变形菌门的丰度显著增加, 10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1}和 60 g·kg^{-1}处理分别较 CK 处理增加 32.3%、21.1%和 16.7%。拟杆菌门是石灰性土壤中的第 2 大菌群, 其丰度在 CK 处理中为 13.16%, 随着生物炭施用量的提高, 该菌群的丰度显著降低, 5 g·kg^{-1}、10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1}和

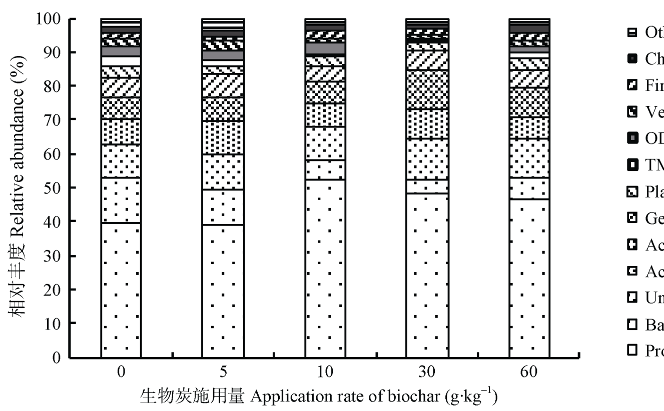


图 3 不同用量生物炭处理石灰性褐土土壤细菌在门水平的相对丰度

Fig. 3 Bacterial community structure at phylum level in calcareous cinnamon soil under different application rates of biochar

60 g·kg^{-1} 处理分别较 CK 处理分别减少 22.1%、55.3%、66.8%和 50.5%。其他各类细菌菌群的丰度在不同处理间也有相应变化(图 4)，可见土壤中施用生物炭会影响土壤中各细菌菌群的丰度。同时热图也对各样本进行了聚类分析，CK 处理和 5 g·kg^{-1} 处理最先聚在一起，30 g·kg^{-1}和 60 g·kg^{-1}处理聚在一起后再和 10 g·kg^{-1}处理聚在一起，说明CK 和5 g·kg^{-1}处理的细菌菌群相似，而 10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1} 和 60 g·kg^{-1} 处理的细菌菌群相似。

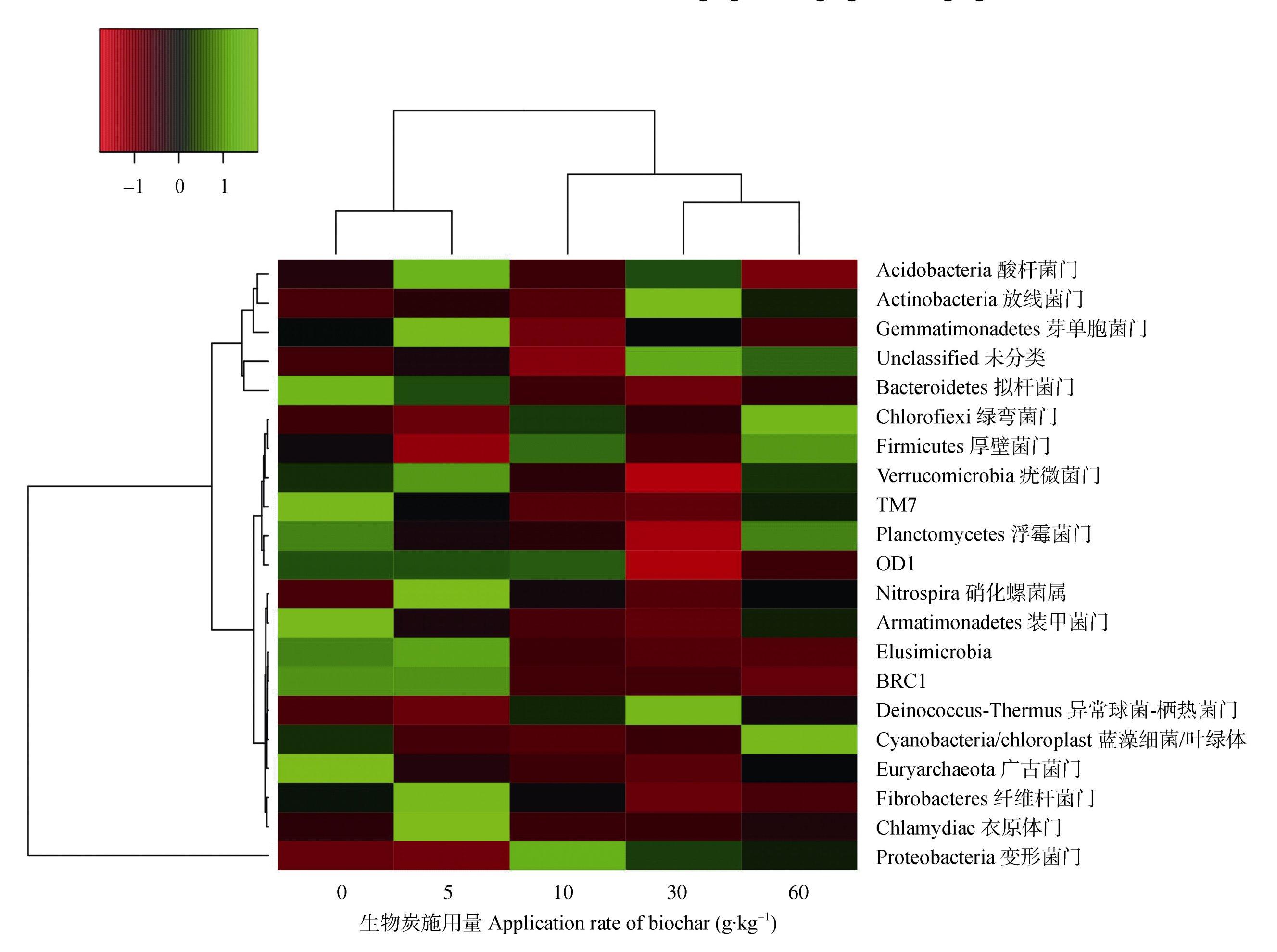


图 4　不同用量生物炭处理石灰性褐土土壤细菌门水平菌群热图

Fig. 4　Heatmap of bacterial community in cinnamon soil at phylum level under different application rates of biochar

3　讨论与结论

评价土壤微生物群落的方法主要有以生化技术为基础的群落水平生理学指纹(Biolog 方法)、生物标记法(PLFA)，以及以现代分子生物学为基础的 DNA 长度多态性(T-RFLP)和 DNA 成分多态性(DGGE)及高通量测序技术。Biolog 微平板法以微生物对不同碳源的利用差异反映土壤微生物群落代谢能力的不同，碳源平均颜色变化率(AWCD)及土壤微生物代谢功能多样性指数在一定程度上可以反映土壤微生物的活性及多样性[29]。本研究结果表明，随着生物炭施用量的增加，AWCD 值、土壤微生物代谢功能多样性指数、碳源利用丰富度指数均呈降低的趋势，总体表现为：5 g·kg^{-1}≈CK>10 g·kg^{-1}>30 g·kg^{-1}>60 g·kg^{-1}处理，CK 和 5 g·kg^{-1} 处理间差异不显著，而 10 g·kg^{-1}、30 g·kg^{-1} 和 60 g·kg^{-1} 处理在整个培养期间的 AWCD 值和多样性指数显著低于 CK 处理；均匀度指数随着生物炭施用量的增加而增加，这是因为大量生物炭的施入提高了土壤 C/N，而土壤微生物群落酶链反应速度和最终能达到的程度与群落内能利用单一碳源(底物)微生物的数目和种类相关[28]，在没有氮肥投入下生物炭的施入一方面可能是使土壤微生物的数量降低，另一方面可能是生物炭抑制某些种类微生物的生长而使其种类减少，说明生物炭的施入改变了土壤原有微生物群落组分，抑制了原有土壤微生物种类的生长，增加了适应环境的一些特异微生物的种群。Dempster 等[30]的研究结果表明，高用量生物炭处理较对照显著降低了微生物量碳。乌英嘎[31]、Marluthi 等[32]的研究结果也表明，土壤中施入生物炭改变了土壤微生物利用碳源的种类，这与

本文研究结果一致。但也有研究表明，白浆土、潮土、灰漠土和棕壤土上施用玉米芯生物炭，试验前期未添加生物炭处理的 AWCD 以及多样性指标均高于添加生物炭处理，而试验后期生物炭施用量为 40 t·hm^{-2}(相当于本试验的 16 g·kg^{-1} 用量)处理的 AWCD 值以及多样性指数最高[33]，这一方面与试验所用生物炭的原料及生产工艺不同从而使生物炭的理化性质不同有关，主要体现在全碳含量及生物炭的 pH 值上，也与土壤的质地和酸碱度有关，另一方面也与作物种类不同有关，作物的根系分泌物对土壤微生物多样性产生了影响[34]。

鉴于 Biolog 微平板法仅检测可培养的微生物，不能全面反映土壤微生物的代谢多样性，因此本文结合高通量测序的方法，从基因多样性的水平上研究生物炭对土壤细菌多样性的影响。变形菌门、拟杆菌门、酸杆菌门、放线菌门、芽单胞菌门、浮霉菌门、疣微菌门、厚壁菌门和绿弯菌门是石灰性褐土的主要细菌菌群，施用生物炭能显著增加土壤中变形菌门的丰度，但却降低了拟杆菌门的丰度，可见生物炭影响了土壤中各细菌菌群的分布。5 g·kg^{-1} 和 CK 处理具有相似的细菌菌群，石灰性褐土中生物炭施用量为 5 g·kg^{-1} 时，不会影响土壤细菌的多样性。与 Biolog 方法不一致的是随着生物炭施用量的增加，土壤细菌的 OTU 数目及丰富度指数呈增加的趋势，而多样性指数在 CK 和 60 g·kg^{-1} 处理较高，其余处理显著低于以上两处理，这主要是因为决定该指数大小的因素一是种群数目，即丰富度；二是种群中个体分布的均匀性。因各处理的丰富度随生物炭用量的增加而增加，所以导致 5 g·kg^{-1}、10 g·kg^{-1} 和 30 g·kg^{-1} 处理多样性较低的原因可能是其细菌菌群分布的不均匀性，菌群丰度分布图(图 4)也说明了这一点。两种方法进行多样性分析的差异一方面可能是由于各自方法的侧重点有所不同，另一方面是仅对土壤细菌进行了高通量测序分析，而未涉及其他种类的微生物，这有待于进一步深入研究。

Biolog 以及高通量测序方法均表明，生物炭施入土壤后使土壤原有微生物群落组分发生改变，影响了土壤细菌各菌群在土壤中的丰度，使其分布的均匀性降低。为了不影响微生物群落结构和功能，石灰性褐土上秸秆生物炭每次施用量不能超过 5 g·kg^{-1}(干土)。

参考文献 References

[1] Lal R. World crop residues production and implications of its use as a biofuel[J]. Environment International, 2005, 31(4): 575–584

[2] 李飞跃，汪建飞. 中国粮食作物秸秆焚烧排碳量及转化生物炭固碳量的估算[J]. 农业工程学报, 2013, 29(14): 1–7
Li F Y, Wang J F. Estimation of carbon emission from burning and carbon sequestration from biochar producing using crop straw in China[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2013, 29(14): 1–7

[3] Lehmann J, Joseph S. Biochar for Environmental Management: Science and Technology[M]. London: Earthscan, 2009

[4] Shrestha G, Traina S J, Swanston C W. Blank carbon's properties and role in the environment: A comprehensive review[J]. Sustainability, 2010, 2(1): 294–320

[5] Lenton T M. The potential for land-based biological CO_2 removal to lower future atmospheric CO_2 concentration[J]. Carbon Management, 2010, 1(1): 145–160

[6] Okimori Y, Ogawa M, Takahashi F. Potential of CO_2 emission reductions by carbonizing biomass waste from industrial tree plantation in south Sumatra Indonesia[J]. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change, 2003, 8(3): 261–280

[7] 刘玉学，刘微，吴伟祥，等. 土壤生物质炭环境行为与环境效应[J]. 应用生态学报, 2009, 20(4): 977–982
Liu Y X, Liu W, Wu W X, et al. Environmental behavior and effect of biomass-derived black carbon in soil: A review[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2009, 20(4): 977–982

[8] Van Zwieten L, Kimber S, Morris S, et al. Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility[J]. Plant and Soil, 2010, 327(1/2): 235–246

[9] 陈红霞，杜章留，郭伟，等. 施用生物炭对华北平原农田土壤容重、阳离子交换量和颗粒有机质含量的影响[J]. 应用生态学报, 2011, 22(11): 2930–2934
Chen H X, Du Z L, Guo W, et al. Effects of biochar amendment on cropland soil bulk density, cation exchange capacity, and particulate organic matter content in the North China Plain[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2011, 22(11): 2930–2934

[10] 高海英，何绪生，陈心想，等. 生物炭及炭基硝酸铵肥料对土壤化学性质及作物产量的影响[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(10): 1948–1955
Gao H Y, He X S, Chen X X, et al. Effect of biochar and biochar-based ammonium nitrate fertilizers on soil chemical properties and crop yield[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2012, 31(10): 1948–1955

[11] Gaskin J W, Steiner C, Harris K, et al. Effect of low-temperature pyrolysis conditions on biochar for agricultural use[J]. Transactions of the ASABE, 2008, 51(6): 2061–2069

[12] 张祥，王典，姜存仓，等. 生物炭对我国南方红壤和黄棕壤理化性质的影响[J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(8): 979–984
Zhang X, Wang D, Jiang C C, et al. Effect of biochar on physicochemical properties of red and yellow brown soils in the South China Region[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2013, 21(8): 979–984

[13] 王浩，焦晓燕，王劲松，等. 生物炭对土壤水分特征及水胁迫条件下高粱生长的影响[J]. 水土保持学报, 2015, 29(2): 253–257

Wang H, Jiao X Y, Wang J S, et al. Effects of biochar on water characteristics of soil and Sorghum growth under conditions of soil water stress[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2015, 29(2): 253–257

[14] Glaser B, Lehmann J, Zech W. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal — A review[J]. Biology and Fertility of Soils, 2002, 35(4): 219–230

[15] 王浩, 焦晓燕, 王劲松, 等. 不同氮肥水平下生物炭对高粱苗期生长及有关生理特性的影响[J]. 华北农学报, 2014, 29(6): 195–201
Wang H, Jiao X Y, Wang J S, et al. Effect of biochar on seedling growth and related physiological characteristics of sorghum under different levels of nitrogen fertilizer[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2014, 29(6): 195–201

[16] 高德才, 张蕾, 刘强, 等. 生物黑炭对旱地土壤磷动态变化的影响[J]. 水土保持学报, 2013, 27(6): 256–260
Gao D C, Zhang L, Liu Q, et al. Effects of biochar on dynamics change of phosphorus in dryland soil[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2013, 27(6): 256–260

[17] 高德才, 张蕾, 刘强, 等. 旱地土壤施用生物炭减少土壤氮损失及提高氮素利用率[J]. 农业工程学报, 2014, 30(6): 54–61
Gao D C, Zhang L, Liu Q, et al. Application of biochar in dryland soil decreasing loss of nitrogen and improving nitrogen using rate[J]. Transactions of the CSAE, 2014, 30(6): 54–61

[18] Kirk J L, Beaudette L A, Hart M, et al. Methods of studying soil microbial diversity[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 58(2): 169–188

[19] Steenwerth K L, Jackson L E, Calderón F J, et al. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(11): 1599–1611

[20] Pietikäinen J, Kiikkilä O, Fritze H. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus[J]. Oikos, 2000, 89(2): 231–242

[21] O'Neill B, Grossman J, Tsai M T, et al. Bacterial community composition in Brazilian anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification[J]. Microbial Ecology, 2009, 58(1): 23–35

[22] Grossman J M, O'Neill B E, Tsai S M, et al. Amazonian anthrosols support similar microbial communities that differ distinctly from those extant in adjacent, unmodified soils of the same mineralogy[J]. Microbial Ecology, 2010, 60(1): 192–205

[23] Khodadad C L M, Zimmerman A R, Green S J, et al. Taxa-specific changes in soil microbial community composition induced by pyrogenic carbon amendments[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43(2): 385–392

[24] 何莉莉, 杨慧敏, 钟哲科, 等. 生物炭对农田土壤细菌群落多样性影响的 PCR-DGGE 分析[J]. 生态学报, 2014, 34(15): 4288–4294
He L L, Yang H M, Zhong Z K, et al. PCR-DGGE analysis of soil bacterium community diversity in farmland influenced by biochar[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(15): 4288–4294

[25] Glassen A T, Boyle S I, Haskins K E, et al. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: Plate type and incubation temperature influences on contrasting soils[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 44(3): 319–328

[26] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(8): 2351–2359

[27] Schutter M E, Dick R P. Shifts in substrate utilization potential and structure of soil microbial communities in response to carbon substrates[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(11): 1481–1491

[28] Garland J L. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1997, 24(4): 289–300

[29] 李玉洁, 李刚, 宋晓龙, 等. 休牧对贝加尔针茅草原土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 草业学报, 2013, 22(6): 21–30
Li Y J, Li G, Song X L, et al. Effect of rest-grazing on soil microbial community functional diversity in *Stipa baicalensis* steppe[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2013, 22(6): 21–30

[30] Dempster D N, Gleeson D B, Solaiman Z M, et al. Decreased soil microbial biomass and nitrogen mineralisation with Eucalyptus biochar addition to a coarse textured soil[J]. Plant and Soil, 2012, 354(1/2): 311–324

[31] 乌英嘎. 生物质炭施用对华北潮土土壤理化性质及微生物多样性的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古师范大学, 2014
Wu Y S. Effects of biochar application on bacterial diversity and physical-chemical properties in fluvor-aquic soil of North China[D]. Huhhot: Inner Mongol Normal University, 2014

[32] Marluthi S, Ralebitso-Senior T K, Rahman P K S M, et al. Biochar: Impact on Soil Microbial Ecology[C]//Second Annual Conference: Advancing the Science and Evaluating Biochar Systems. Rothamsted: Poster Presented al UK Biochar Reacher Centre, 2010

[33] 韩光明. 生物炭对不同类型土壤理化性质和微生物多样性的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2013
Han G M. Effect of biochar on soil physicochemical property and microbial diversity in different soil types[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2013

[34] 吴凤芝, 李敏, 曹鹏, 等. 小麦根系分泌物对黄瓜生长及土壤真菌群落结构的影响[J]. 应用生态学报, 2014, 25(10): 2861–2867
Wu F Z, Li M, Cao P, et al. Effects of wheat root exudates on cucumber growth and soil fungal community structure[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2014, 25(10): 2861–2867